

胆管発癌・進展過程におけるKeap1-Nrf2経路の寄与の解明

著者	鍋島 立秀
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第19122号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00129217

博士論文

胆管発癌・進展過程における Keap1-Nrf2 経路の寄与の解明

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

内科病態学講座 消化器病態学分野

鍋島 立秀

I 要約

胆道癌は早期発見が困難であり、非切除例に対する有効治療の欠如のためいまだ予後不良な消化器癌である。胆道癌の新規治療開発にはその進展に関わる分子メカニズムの解明が不可欠である。Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) – NF-E2-related factor 2 (Nrf2)経路は酸化ストレスにより活性化し、抗酸化遺伝子を含む多くの遺伝子発現を制御することで細胞・臓器機能を保護している。同経路は様々な癌で活性化しており、癌進展や治療抵抗性の獲得に寄与することが明らかとなっている。

本検討ではヒト胆道癌手術検体を用いて、一部の症例でNRF2の分解に関わるKEAP1発現低下がみられることを見出した。肝特異的に変異 *K-ras* および *p53* を発現するマウスに Keap1 conditional knockout を付加したモデルマウスを作成し、胆管細胞への分化傾向を示す異型胆管上皮の増生がみられること、一部のマウスでは周囲臓器への浸潤や遠隔転移を来す浸潤癌が形成されることを確認した。Keap1 欠損付加に伴い発現が増加する遺伝子群をマイクロアレイにて抽出したところ、Nrf2 の代表的な標的遺伝子である *NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (Nqo1)*や *Glutathione S-transferase mu 1 (Gstm1)*に加え、胆管分化に関わる転写因子、*Sox4* および *Sox9* の増加が判明した。免疫染色では Sox9 陽性を示す異型胆管上皮の増生が確認され、Keap1-Nrf2 経路の活性化による Sox9 誘導が発癌促進に寄与していると考えられた。ヒト胆管癌組織においても KEAP1 陰性・NQO1 陽性を示す群では KEAP1 陽性・NQO1 陰性群より有意に SOX9 発現が高率であった。

さらに、Keap1 欠損による Nrf2 活性化が他の消化器癌モデルにおいても発癌促進効果を持しているかを明らかにするため、腭特異的な変異 *K-ras* および *p53* 発現により浸潤性腭癌を生じる KPC マウスへ Keap1 conditional knockout を付加して検討した。腭癌モデルマウスでは腭特異的な Keap1 欠損と変異 *K-ras* 発現によって腭実質の著明な変性脱落が進行し、吸収不良により致死的事となることが明らかになった。腭においては既報で KPC マウスへの Nrf2 ノックアウト付加が癌進展を抑制することが報告されているが、Keap1 欠損による持続的な Nrf2 活性化は必ずしも癌進展を促進しないとの結果であった。

本研究により、胆管癌では Keap1 の機能喪失による Nrf2 活性化が他の癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異と協調して癌進展に寄与している可能性が示された。Nrf2 活性化の程度や下流の標的遺伝子発現レベルによる予後予測は困難であったが、抗癌剤への感受性や進展形式との関連、新規薬剤スクリーニングへの応用など今後の検討につながる知見であると考えられる。また、腭癌モデルマウスでの解析結果から Keap-Nrf2 経路のもつ context-specific な作用について、臓器横断的に評価する必要性も示唆された。薬剤の全身投与による Nrf2 経路への介入に際してはこのような観点からの知見集積が望まれる。

II 略語一覧

ALT: alanine transaminase

α SMA: α -smooth muscle actin

AST: aspartate transaminase

Cul3: Cullin 3

FGFR: fibroblast growth factor receptor

Gstm1: Glutathione S-transferase mu 1

HO-1: heme oxygenase-1

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

Nqo1: NAD(P)H quinone dehydrogenase 1

Nrf2: NF-E2-related factor 2

III 研究背景

胆管癌は消化器癌の中でも早期発見が困難であり、切除不能例に対する根治的治療も存在しないためその予後は不良である¹⁾。外科的切除は根治療法となりうるが、約 3 分の 2 の症例では手術不能である。従来型抗癌剤による治療の効果は限定的であり、胆管癌の抗癌剤耐性・治療抵抗性の獲得はいまだ克服されていない¹⁾。胆管癌の遺伝子変異解析により、いくつかの潜在的なドライバー変異が見出されている。これらの遺伝子には *K-ras*、*p53*、*IDH1*、*PTEN* などが含まれるが、その頻度は一様なものではなく胆管癌の多様性が示唆されている²⁾。他の研究では、胆管癌の一部に fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) 融合遺伝子陽性群が見出されている³⁾。このような患者群では FGFR 分子中のキナーゼ活性阻害剤が奏功すると考えられ、実際に抗腫瘍効果を示す薬剤が同定されている^{4,5)}。胆管癌の予後改善のためには、このような特異な遺伝子変異を持たない患者群においても新たに標的となりうる分子を特定することが必要である。

癌細胞は過酷な微小環境への適応を果たすことにより浸潤癌形成に至る。中でも、酸化ストレスは細胞傷害や細胞死を引き起こす因子として重要である。Keap1-Nrf2 経路は酸化ストレス応答を司るシグナル伝達経路であり、解毒酵素・代謝酵素の誘導を介して酸化ストレスの消去に働く⁶⁾。転写因子である Nrf2 の活性は Keap1 と Cullin 3 (Cul3) ユビキチンリガーゼを含む蛋白質複合体による制御を受ける⁷⁾。正常な状態では Nrf2 は本複合体によるユビキチン化を受け、プロテオソームにより分解される。一方、酸化ストレスや外来物質により Keap1 の立体構造が変化することで、Nrf2 は分解を免れて核内に移行し、標的遺伝子群の

発現を誘導する⁶⁾。本メカニズムは正常組織構築の維持や臓器機能の保護に必須であるが、癌細胞においては細胞生存や抗癌剤・放射線耐性の誘導に寄与することが明らかになっている(図 1)。

Keap1-Nrf2 経路の活性化は様々な癌で認められる。*K-ras* や *Myc* などの癌遺伝子の活性化型変異は Nrf2 活性化を来し、酸化ストレス消去能や腫瘍形成能の亢進につながる⁸⁾。食道癌患者の癌組織においてみられる NRF2 変異は予後不良因子であり、KEAP1 との相互作用に関わるドメインに高頻度であることが報告されている⁹⁾。エクソンスキッピングを来す NRF2 遺伝子の微小欠失は肺癌や頭頸部癌の一部の患者でみとめられている¹⁰⁾。また、非小細胞肺癌患者でみられる KEAP1 の機能喪失変異は、抗癌剤耐性の予測因子であることが判明した¹¹⁾。胆管癌を対象とした遺伝子解析はその希少性により限られているが、胆嚢癌を対象とした解析により KEAP1 変異による NRF2 活性化がみられることが報告されている¹²⁾。胆管癌における FoxO3 不活化が Keap1 転写を抑制することにより Nrf2 を活性化することも明らかになっており、胆管癌における Nrf2 活性化は発癌および進展過程に寄与している可能性が高い。

IV 研究目的

胆管癌の発癌・進展過程における Keap1-Nrf2 経路の寄与を明らかにし、治療標的となりうる癌進展メカニズムを解明することを目的とした。

V 研究方法

1. 研究試料

Histone H3 抗体(4499)、HNF-4 α 抗体(3113)、peroxidase-conjugated anti-rabbit 抗体(7074)は Cell Signaling Technology (Beverly, MA)より購入した。Nqo1 抗体(ab2346)、cytokeratin 19 抗体(133496)、 α -smooth muscle actin (α SMA)抗体(ab5694)は Abcam (Cambridge, United Kingdom)より購入した。Sox9 antibody (AB5535) は Merck (Darmstadt, Germany)より購入した。Nrf2 抗体および Keap1 抗体は東北大学大学院医学系研究科医化学分野より供与された^{14, 15)}。KEAP1 抗体は Proteintech (Rosemont, IL)より購入した。Peroxidase-conjugated anti-mouse 抗体は GE Healthcare (Piscataway, NJ)より購入した。Peroxidase-conjugated anti-goat 抗体(sc-2020)は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)より購入した。その他の試薬は特記ない場合、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)より購入した。

2. マウス

Keap1^{FA/FA} マウス・Keap1^{FB/FB} マウスは東北大学大学院医学系研究科医化学分野より供与された^{16, 17)}。肝特異的に Cre を発現させる Alb-Cre マウスは The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)より導入した¹⁸⁾。膵特異的に Cre を発現させる Pdx-1-Cre マウス、K-ras^{LSL-G12D/+} マウスおよび p53^{LSL-R172H/+} マウスは NCI mouse repository (Frederick, MD)より導入した^{19, 20, 21)}。上記のマウスを交配し、以下のマウスを作成した: Alb-Cre (A), Alb-Cre::p53^{LSL-R172H/+} (AP), Alb-Cre::K-ras^{LSL-G12D/+} (AK), Alb-Cre::K-ras^{LSL-G12D/+}::p53^{LSL-R172H/+} (AKP), Alb-

Cre::Keap1^{FB/FB} (A::Keap1), Alb-Cre::p53^{LSL-R172H/+}::Keap1^{FB/FB} (AP::Keap1), Alb-Cre::K-
 ras^{LSL-G12D/+}::Keap1^{FB/FB} (AK::Keap1), Alb-Cre::K-ras^{LSL-G12D/+}::p53^{LSL-R172H/+}::Keap1^{FB/FB}
 (AKP::Keap1), Pdx-1-Cre (C), Pdx-1-Cre::p53^{LSL-R172H/+} (PC), Pdx-1-Cre::K-ras^{LSL-G12D/+}
 (KC), Pdx-1-Cre::K-ras^{LSL-G12D/+}::p53^{LSL-R172H/+} (KPC), Pdx-1-Cre::Keap1^{FA/FA} (C::Keap1),
 Pdx-1-Cre::p53^{LSL-R172H/+}::Keap1^{FA/FA} (PC::Keap1), Pdx-1-Cre::K-ras^{LSL-G12D/+}::Keap1^{FA/FA}
 (KC::Keap1), Pdx-1-Cre::K-ras^{LSL-G12D/+}::p53^{LSL-R172H/+}::Keap1^{FA/FA} (KPC::Keap1)。Genomic
 DNA を用いて各遺伝子型の genotyping を実施した。マウスの取り扱いには研究機関等にお
 ける動物実験等の実施に関する基本指針(文科省)に基づいて実施した。本研究は国立大
 学法人東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会への申請・承認のもと実施した
 (2019MdA-008)。マウスの体重は生後1週間ごとに計測し、明らかな衰弱を示すもの、運動
 性が低下したもの、1週間当たり 20%以上の体重減少を示すものは人道的エンドポイントとし
 て安楽死させた。マウスは生後 90 日で犠牲死させ、その後の解析に供した。解析時点の血
 液検体を用いて血算および生化学検査を実施した。マウスの胆管上皮において、組織学的
 に核の濃染、核の大小不同、多層化、核分裂像、明瞭な核小体などを認めるものを細胞異
 型として定義した。

3.免疫組織化学染色

ヒト胆道癌手術検体は東北大学医学部倫理委員会の承認のもとに使用した (2015-1-
 612, 2018-1-617)。ヒトおよびマウス肝および膵組織は 4%パラホルムアルデヒド(和光純薬)

にて固定後パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオシン染色(H&E 染色)と免疫組織化学染色(IHC)に供した。ヒト組織の KEAP1 染色に際してはスライドを target retrieval solution (Dako, Glostrup, Denmark)中で 10 分間、121℃でオートクレーブし抗原賦活を行った。ヒト組織の NQO1 染色、SOX9 染色、マウス組織の Nqo1、HNF-4 α 、Keratin 19、Sox9 染色に際しては pH 6.0 のクエン酸バッファー中で 10 分間、121℃でオートクレーブし抗原賦活を行った。一次抗体との反応は 4℃、overnight にて行った。スライドの発色は一次抗体に応じてヒストファインキットまたはヒストファイン マウスステインキット(ニチレイ)、ビオチン標識 anti-goat immunoglobulin 抗体(Dako)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(abcam)との反応後(室温、1 時間)、diaminobenzidine (和光純薬)を使用して行った。

4. ウエスタンブロット

マウス肝組織の核分画と細胞質分画の分離には NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を使用した。サンプルは NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific) にて 150V、40 分間泳動し、Immobilon-P Membrane (Merck Millipore, Billerica, MA)へ 40V、75 分間の条件でブロッティングした。ブロッキングは 5%脱脂粉乳溶液と室温で 1 時間反応させ、一次抗体との反応は 4℃、overnight にて行った。特異バンドの検出は一次抗体に応じたペルオキシダーゼ標識二次抗体との反応後(室温、1 時間)、ECLTM Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, England)にて行った。

5. マイクロアレイ

AKP および AKP::Keap1 マウス肝組織より、RNeasy kit (QIAGEN, Valencia, CA)を用いて total RNA を抽出した(各群 2 検体)。500ng の total RNA を Quick-Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)にて標識し、whole mouse genome Oligo DNA Microarray ver2.0 (Agilent Technologies)スライドとの hybridization を行った。反応後のアレイチップのスキャンは G2539A microarray scanner system (Agilent)を用いて行った。GeneSpring GX software (Agilent)によるデータ処理を行い、正規化後データで 2 倍以上の上昇をみとめる遺伝子を発現増加遺伝子、0.5 倍以下に低下した遺伝子を発現低下遺伝子とした。

6. RNA extraction and qRT-PCR

マウス肝組織 total RNA 1 μ g を SuperScript VIRO™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific)により逆転写し、cDNA とした。定量的 RT-PCR は StepOnePlus™ real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific)と Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用い、以下のプライマーセットを使用して行った。

β -actin (5' -GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3' , 5' -CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3')²²⁾, Nqo1 (5' -AGCGTTCGGTATTACGATCC-3' , 5' -AGTACAATCAG GGCTCTTCTCG-3')²³⁾, Gstm1 (5' -

CTACCTTGCCCGAAAGCAC-3' , 5' -ATGTCTGCACGGATCCTCTC-3')²³⁾, Sox9

(5' -AGTACCCGCATCTGCACAAC-3' , 5' -ACGAAGGGTCTCTTCTCGCT-3')²²⁾

7.統計解析

すべての定量値は平均値±標準偏差で表記した。統計解析には JMP Pro version 14 (SAS Institute, Cary, NC)を用いた。KEAP1 発現・NQO1 発現・SOX9 発現と無再発生存期間・全生存期間との関連は log-rank test にて解析した。免疫染色パターン間の関連は χ^2 検定で、3 群間以上の差の比較は Tukey-Kramer method を用いて行った。 P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。

VI 研究結果

1. ヒト胆管癌組織における KEAP1 および NQO1 発現の確認

ヒト胆管癌手術検体を用いて、免疫組織化学にて KEAP1 発現と、NRF2 活性化の代替マーカーとして NQO1 発現を評価した。腫瘍細胞の 50%以上が陽性を示すものを陽性と定義した。検討症例 43 例のうち、15 例では KEAP1 陰性・NQO1 陽性であった(図 2A-C)。KEAP1 陽性・NQO1 陰性であったのは 14 例であった(図 2D-F)。以上の結果から、ヒト胆管癌の一部では KEAP1 発現と NQO1 発現が相互排他的であると考えられた。以前の報告では肝癌においてアダプター蛋白である p62 蓄積によって KEAP1 機能が競合的に阻害され NRF2 活性化につながるとのメカニズムが報告されているため²⁴⁾、KEAP1 陽性かつ NQO1 陽性を示す胆管癌症例で p62 発現を確認したが、有意な発現増加は認めなかった(データは提示せず)。以上の検討により、ヒト胆管癌の一部では KEAP1 発現の低下による NRF2 活性化があるものと推測された。KEAP1 陰性・NQO1 陽性群と KEAP1 陽性・NQO1 陰性群で予後を比較したが、有意な生存期間の差は認めなかった(図 3)。

2. 肝特異的な変異 *K-ras* および *p53* 発現マウスの作成

肝特異的な変異 *K-ras* 発現と *p53* 欠失によって胆管癌を生じるマウスモデルが報告されている²⁵⁾。本検討では *p53* 欠損に代わり、dominant negative に作用する変異 *p53* (*p53*^{R172H}) を肝特異的に発現させるマウスを使用した(図 4A)。Alb-Cre のみ発現する A マウス、*p53* 変異のみ発現する AP マウスでは肝組織に変化を認めなかった(図 4B, C)。図 4D, E に示す

如く、*K-ras* 変異のみ導入した AK マウス及び *K-ras* および *p53* 変異を導入した AKP マウスではわずかに異型を有する胆管上皮の増生を認めた。しかしながら生後 90 日時点で解析した AKP マウス 14 頭において、明らかな胆管癌の発生は認めなかった。肝体重重量比 (図 5A)、肝酵素 (図 5B, C)、血清ヘモグロビン (図 5D) についても AK マウス・AKP マウスと A マウス・AP マウスで明らかな変化は見られなかった。生後 150 日まで飼育期間を延長した AKP マウスについても、明らかな胆管癌の発生は認めなかった。

3. 肝特異的 Keap1 欠損付加による胆管発癌促進

A マウス・AP マウス・AK マウス・AKP マウスへの Keap1^{FB/FB} バックグラウンド導入 (図 6A) により、A::Keap1 マウス・AP::Keap1 マウス・AK::Keap1 マウス・AKP::Keap1 マウス肝組織において Nrf2 の核での増加と細胞質での Keap1 発現の低下がみられることを確認した (図 6B)。まず、AK マウス及び AKP マウス肝組織で Nrf2 標的遺伝子である Nqo1 発現がみられるかを確認したが、明らかな発現は認めなかった (図 7A-D)。A::Keap1 マウスと AP::Keap1 マウスでは肝に組織学的変化を認めなかったが、胆管が Nqo1 陽性を示した (図 7E-H)。AK::Keap1 マウス・AKP::Keap1 マウスでは胆管に類似した管腔構造が増生していた (図 7I, M)。この管腔構造も Nqo1 陽性を示しており (図 7J, N)、Keap1 欠損による Nrf2 活性化の結果と考えられた。増生した管腔構造を構成する細胞は cytokeratin 19 陽性を示し、HNF-4 α は疎らに陽性であり (図 7K, L, O, P) 胆管細胞優位な分化傾向を示した。生後 90 日における AK::Keap1 マウス・AKP::Keap1 マウスの肝体重重量比は A::Keap1 マウス・AP::Keap1 マ

ウスよりも有意に増加しており、胆管細胞からなる管腔構造の増加の影響と考えられた(図 8A)。肝酵素(図 8B, C)、血清ヘモグロビン(図 8D)については AK::Keap1 マウス・AKP::Keap1 マウスと A::Keap1 マウス・AP::Keap1 マウスで有意な差を認めなかった。

4. 肝特異的 Keap1 欠損・変異 *K-ras* および *p53* 発現による胆管癌の発生

生後 90 日時点までに、AKP::Keap1 マウスの一部(35 頭中 11 頭)では肉眼的に確認可能な肝腫瘍の発生がみられた(図 9A)。腫瘍の中には血性腹水や腹膜播種、リンパ節転移を伴うものを認め(図 9B, C)、浸潤癌として矛盾しない進展を示した。組織像では腫瘍細胞は管腔構造を有する腺癌であり、胆管癌組織に類似していた(図 9D, E)。生後 90 日までに浸潤癌を形成した AK::Keap1 マウスは認めなかった。AKP::Keap1 マウスと AKP マウスを比較検討した結果から、肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現に Keap1 欠損による Nrf2 活性化が加わることで、胆管発癌の促進につながることが明らかとなった。

5. 肝組織における遺伝子発現プロファイルの比較

AKP::Keap1 マウスにおいて、AKP マウスに比べ有意な発現増加を呈する遺伝子をマイクロアレイにより抽出した(図 10A)。代表的な遺伝子群を表 3 に示す。AKP::Keap1 マウス肝組織では、Nqo1 や glutathione-S-transferase ファミリー遺伝子、ATP-binding cassette ファミリー遺伝子など典型的な Nrf2 標的遺伝子の発現増加を認めた。これらに加え、gamma-glutamyltransferase ファミリー遺伝子や EpCAM、cytokeratin 7 や 19、転写因子である Sox9

等の胆管細胞関連遺伝子²⁶⁾の発現が増加していた。代表的な発現増加遺伝子については、リアルタイム RT-PCR により発現増加を確認した(図 10B)。AKP::Keap1 マウスでは AKP マウスに比べ、Nrf2 標的遺伝子である Nqo1、Gstm1 に加えて転写因子である Sox9 の有意な増加を認めた。AK::Keap1 マウス・AKP::Keap1 マウス肝組織にみられた管腔構造を構成する細胞は Sox9 陽性であった(図 10C-F)。

6. ヒト胆管癌組織における SOX9 発現

ヒト胆管癌組織における SOX9 発現を免疫組織化学で確認した(図 11A-H)。SOX9 陽性を示した症例は 43 例中 17 例であった。KEAP1 発現・NQO1 発現パターンとの関連を検討したところ、KEAP1 陰性・NQO1 陽性であった 15 例中 SOX9 発現陽性であったのは 11 例、KEAP1 陽性・NQO1 陰性であった 14 例中では 3 例と、KEAP1 陰性・NQO1 陽性群で有意に高率であった($P = 0.0052$ 、 χ^2 検定)。以上の結果から、ヒト胆管癌においても KEAP1 発現による NRF2 活性化が SOX9 発現増加に寄与している可能性が考えられた。SOX9 陽性例・陰性例で無再発生存期間・全生存期間を比較した結果では、有意な差は認めなかった(図 12)。

7. KPC マウスにおける Keap1 欠損付加の検討

胆管癌モデルで認められた、Keap1 欠損による Nrf2 活性化の癌促進作用が他種発癌モデルマウスでも再現できるかを確認するため、膵癌モデルマウスとして広く利用されている

KPC マウス²⁷⁾へ腓特異的 Keap1 欠損を付加して解析した。KPC マウスへの Keap1 欠損付加は図 13A に示すような交配にて行った。C::Keap1 マウス及び P::Keap1 マウスは生後 90 日まで体重変化などを認めず、早期死亡は認めなかった(図 13B)。一方、K::Keap1 マウス及び KP::Keap1 マウスでは生後 30 日から 60 日の間に多くのマウスが衰弱し死亡または人道的エンドポイントに至った(図 13B)。K::Keap1 マウス及び KP::Keap1 マウスでは体重減少がみられ(図 14A)、解剖時の採血では血糖値の低下を認めた(図 14B)。

8. 腓特異的変異 *K-ras* 発現と Keap1 欠損による腓萎縮の誘導

人道的エンドポイントに至った K::Keap1 マウスおよび KP::Keap1 マウスでは、腓は著明に萎縮しており白色の固い組織に置換されていた(図 15)。組織では腺房細胞・ラ氏島細胞とも変性・脱落を認め、著明な線維化が確認された(図 16)。残存した腓管上皮やラ氏島には Nqo1 発現を認め、Keap1 欠損による恒常的な Nrf2 活性化の影響と考えられた。解剖時点で KC::Keap1 マウスおよび KPC::Keap1 マウスに腓癌の形成は認められなかった。生後2週の時点で KC::Keap1、KPC::Keap1 マウス腓の組織を採取して組織学的に検討したところ、腓腺房細胞およびラ氏島細胞の形成は C::Keap1 および P::Keap1 マウスと同様であった(図 17)。しかしながら KC::Keap1 および KPC::Keap1 マウスでは小葉間に炎症細胞浸潤を認め、腺房細胞一部には壊死がみられ、周囲に α SMA 陽性を示す活性化腓星細胞の出現を確認した(図 17)。以上の結果から、胆管において変異 *K-ras* および *p53* 発現による発癌

が Keap1 欠損により促進されるのとは異なり、膵においては変異 *p53* 発現の有無にかかわらず変異 *K-ras* 発現と Keap1 欠損が進行性の膵萎縮を引き起こすことが明らかになった。

VII 考察

本研究の主たる知見は以下の通りである。①一部のヒト胆管癌における KEAP1 発現減少と・NRF2 活性化の確認、②マウス胆管発癌モデルへの Nrf2 恒常的活性化の付与・発癌促進効果の確認、③Nrf2 活性化による胆管癌促進候補因子 Sox9 の同定、④ヒト胆管癌組織における検証、⑤Nrf2 による癌促進作用の他種動物モデルでの検証

本研究により、Nrf2 の胆管癌促進効果が明らかになった。以前に行われた肝特異的 Keap1 ノックアウトに *Pten* 欠損を付加したマウスモデルでは、胆管細胞の著しい増生を来したものの、発癌には至らないとの結果であった²⁶⁾。この検討では肝特異的 Keap1 ノックアウトの付加により肝組織で胆管細胞関連遺伝子群の広範な発現上昇がみられており、本検討で AKP::Keap1 マウス肝組織でみられた変化と類似していた。この先行研究と本検討では、発癌につながる遺伝子変異が *Pten* ノックアウトか変異 *K-ras* および *p53* 発現かの違いがあり、浸潤癌形成の有無という点での差を生じた可能性がある。また、本検討では肝特異的な変異 *K-ras* および *p53* 発現のみでは発癌に至らなかった。既報では肝特異的な変異 *K-ras* 発現と *p53* 欠失によって胆管癌を生じるとされているが²⁵⁾、この報告で浸潤癌がみられる生後 150 日程度まで飼育期間を延長しても明らかな浸潤癌は認められなかった。本検討に用いた *p53*^{R172H} 変異は膵癌モデルマウスにおいて著明な発癌促進効果を示しており²⁷⁾、発癌への寄与が確認されている変異である。既報と本検討とで、飼育環境の差や交配マウスのバックグラウンドの差がこのような結果につながった可能性が考えられる。また、胆管発癌における *p53* 発現の喪失と、変異 *p53* 発現との影響の差については未解明であり、今後更な

る検討を要すると思われる。具体的にはヒト胆管癌での p53 免疫染色による欠失の確認や、本マウスモデルでの細胞増殖・細胞老化のマーカー発現につき解析が望まれる。

胆管癌における Nrf2 の役割を検討したこれまでの報告は、患者予後や抗癌剤感受性に着目したものであった。胆管癌細胞株で基底状態の Nrf2 発現を評価した検討では Nrf2 高発現細胞株が同定されている²⁸⁾。この細胞株に siRNA による Nrf2 ノックダウンを付加し、5-fluorouracil への感受性が増強したとされている。他の研究では Nrf2 発現レベルによる胆管癌の予後予測が可能か検討しており、Nrf2 の代表的な標的遺伝子の HO-1 発現が高い患者で生存期間が短いとの結果であった²⁹⁾。以上の知見は胆管癌において、Keap1-Nrf2 経路の活性化が癌進展に寄与することを示している。胆嚢癌においては KEAP1 の機能喪失変異が同定されており、癌細胞株の増殖と抗癌剤耐性に寄与することが明らかになっている¹²⁾。本報告は KEAP1 機能喪失による NRF2 活性化がヒト胆道癌において実際に起こりえる先例である。しかし、Nrf2 活性化による癌促進効果を胆管発癌モデルを用いて直接証明した報告は未だにみられない。本検討ではこの点を解明すべく、肝特異的な Keap1 欠損を変異 *K-ras* および *p53* 発現に付加したモデルマウスを作成した。肝特異的な Keap1 欠損は肝細胞における Nrf2 の核での発現を増加させ、胆管細胞において標的遺伝子である Nqo1 発現を増加させた。AKP::Keap1 マウスでは異型胆管上皮の増加のみならず、浸潤性胆管癌の増加を確認した。AKP::Keap1 マウスでは細胆管の増生から発癌に至っており、ductule 型の発癌と考えられる。本モデルはヒト肝内胆管癌に類似した形態を示しており、Keap1 欠損

は肝内胆管癌の発生に関わっている可能性があるものと思われる。以上の結果は Keap1 欠損により胆管癌が促進されることをモデルマウスで直接証明したものである。

網羅的解析の結果、肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現に Keap1 欠損を付加することで、Nrf2 標的遺伝子の発現増加とともに転写因子である Sox9 発現の増加が判明した。Sox9 は多くのシグナル伝達経路の制御を介して、正常発生過程における胆管の分化を司っている³⁰⁾。また、Sox9 陽性細胞は発生段階のみならず胆管癌の発生母地としても注目されている。Sox9 陽性胆管細胞特異的に変異 *K-ras* および *p53* を発現させたモデルでは、肝細胞特異的に変異 *K-ras* および *p53* を発現させるよりも高頻度に胆管癌が発生する³¹⁾。本研究では、肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現に Keap1 欠損を付加することで Sox9 陽性胆管細胞が増加した。本研究で胆管癌が増加した原因として、胆管癌の発生母地となる Sox9 陽性細胞が増加したことが発癌促進につながった可能性が考えられる。ヒト胆管癌の一部でも SOX9 と NQO1 をともに発現する例がみられており、NRF2 活性化と SOX9 発現の関連が示唆された。Nrf2 活性化が直接 Sox9 発現を誘導するか、また Sox9 陽性細胞が真に発癌の母地となっているかは検討の余地があるが、酸化ストレス応答活性化による Sox9 発現誘導という、新たな胆管癌促進メカニズムの存在が考えられる。Nrf2 による Sox9 発現制御はプロモーターを介する直接制御のほか、上流の複数因子の発現変化を介した間接的な制御の可能性もある。詳細なメカニズム解明には Sox9 プロモーター領域の結合配列解析が必要であり、今後の検討課題である。癌進展には癌細胞の浸潤・転移を促進する上皮間葉形質転換も重要であるが、今回の検討ではその誘導因子である Snail, Twist, Zeb1 などの発現は

Keap1 欠損付加で大きな影響を受けていなかった。酸化ストレス応答と癌の浸潤能については他の上皮間葉形質転換関連分子の発現にも注目すべきと思われる。

さらに、Keap1 欠損による癌促進効果が他種モデルマウスでもみられるかを KPC マウス²⁷⁾へ腭特異的 Keap1 欠損を付加することで検証した。当教室の既報では KPC マウスへ Nrf2 欠損を付加することで前癌病変の形成・浸潤癌への進展の両者が抑制されたため³²⁾、Keap1 欠損の付加による Nrf2 の恒常的活性化は腭癌進展にも働くと予想していた。予想に反し、腭特異的 *K-ras* 発現と Keap1 欠損は腭実質の進行性萎縮を誘導することが確認された³³⁾。ゆえに、変異 *K-ras* 発現と Keap1 欠損は一樣な癌化促進につながるわけではなく、context-specific に働く可能性が示唆された。NRF2 活性化につながる KEAP1 の機能喪失変異や、分解抵抗性に至る NRF2 の変異はヒト肺腺癌や食道扁平上皮癌で見られる³⁴⁾。しかしながら腭癌においては、NRF2 高発現を認める腭癌細胞株 5 種類いずれでも KEAP1 の機能喪失変異や NRF2 の分解抵抗性変異がみられなかったとの報告も存在する³⁵⁾。腭組織において変異 *K-ras* 発現と Keap1 欠損が腭萎縮を来すメカニズムは未解明であり、そのような変化が何故胆管では起こりえないかも不明である。腭においては Keap1 欠損による Nrf2 の恒常的な活性化と変異 *K-ras* によるシグナルが内外分泌系細胞の維持を妨げているものと推測されるが、責任分子同定のためには網羅的な解析が必須となる。腭組織での遺伝子発現プロファイル解析は腭組織由来 RNA 検体のクオリティに問題があるため施行できなかったが、オルガノイド培養系などを用いた手法により今後改善を図る予定である。

本研究にはいくつかの limitation が存在する。第一に、Keap1 欠損による Nrf2 活性化が異型胆管上皮の増生・浸潤性胆管癌発生の原因となっているかの証明が挙げられる。この証明には AKP::Keap1 マウスに Nrf2-null バックグラウンドを導入し、Nrf2 欠損を付加したマウスの作成が必要となる。Nrf2 欠損を付加することで異型胆管上皮の出現や胆管癌の発生が減少することが確認できれば、本研究の結論を更に補強する知見となる。第二に、KEAP1 欠損と NQO1 発現増加がみられる症例と KEAP1 発現が保たれ NQO1 発現が亢進していない症例において、生存期間の差がみられなかった点には解析の余地が残されている。NRF2 活性化を伴う癌では細胞増殖の亢進や細胞生存の増強により悪性化がみられるが、本検討では明確な差がみられなかった。NRF2 活性化のない胆管癌症例では他の悪性化機序が存在する可能性があり、NRF2 活性化の有無で層別化した症例において網羅的な解析が必要と思われる。第三に、Nrf2 阻害による胆管癌新規治療の可能性については未評価である。この点については Nrf2 活性化のある胆管癌細胞と Nrf2 活性化のない胆管癌細胞で治療介入を行って比較する必要があるが、肝特異的な変異 *K-ras* および *p53* 発現のみでは浸潤癌を生じるマウスが得られなかったことから解析に至らなかった。この点については AKP::Keap1 マウス胆管癌細胞を樹立したうえで、遺伝子導入により Keap1 を再発現させた細胞株との比較を行うなどのアプローチが考えられる。これらの limitation に対しても将来的に検討を重ねることで新たな知見につながることを期待される。

VIII 結論

Keap1 欠損による Nrf2 活性化は変異 *K-ras* および *p53* による胆管発癌を促進する。Nrf2 活性化を伴う胆管癌症例の特性を明らかにし、Nrf2 による Sox9 誘導メカニズムを解明することで新たな治療標的の同定が期待される。

IX 謝辞

本研究の実施に当たりご指導いただきました正宗淳教授、濱田晋先生、本学医化学教室の山本雅之教授、田口恵子先生に深謝いたします。

X 参考文献

- [1] Banales JM, Cardinale V, Carpino G et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:261–280.
- [2] Zou S, Li J, Zhou H, Frech C et al. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* 2014;5:5696.
- [3] Arai Y, Totoki Y, Hosoda F et al. Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2014;59:1427–1434.
- [4] Mazzaferro V, El-Rayes BF, Droz Dit Busset M et al. Derazantinib (ARQ 087) in advanced or inoperable FGFR2 gene fusion-positive intrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2019;120:165–171.
- [5] Javle M, Lowery M, Shroff RT et al. Phase II study of BGJ398 in patients with FGFR-altered advanced cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol* 2018;36:276–282.
- [6] Suzuki T, Yamamoto M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1–Nrf2 system during cellular stress. *J Biol Chem* 2017;292:16817–16824.
- [7] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 2011;16:123–140.

- [8] DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011;475:106–109.
- [9] Shibata T, Kokubu A, Saito S et al. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia* 2011;13:864–873.
- [10] Goldstein LD, Lee J, Gnad F et al. Recurrent Loss of NFE2L2 exon 2 is a mechanism for Nrf2 pathway activation in human cancers. *Cell Rep* 2016;16:2605–2617.
- [11] Frank R, Scheffler M, Merkelbach-Bruse S et al. Clinical and pathological characteristics of KEAP1- and NFE2L2-mutated non-small cell lung carcinoma (NSCLC). *Clin Cancer Res* 2018;24:3087–3096.
- [12] Shibata T, Kokubu A, Gotoh M et al. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology* 2008;135:1358–1368.
- [13] Guan L, Zhang L, Gong Z et al. FoxO3 inactivation promotes human cholangiocarcinoma tumorigenesis and chemoresistance through Keap1-Nrf2 signaling. *Hepatology* 2016;63:1914–1927.
- [14] Maruyama A, Tsukamoto S, Nishikawa K et al. Nrf2 regulates the alternative first exons of CD36 in macrophages through specific antioxidant response elements. *Arch Biochem Biophys* 2008;477:139–145.

- [15] Watai Y, Kobayashi A, Nagase H et al. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes Cells* 2007;12:1163–1178.
- [16] Okawa H, Motohashi H, Kobayashi A et al. Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:79–88.
- [17] Blake DJ, Singh A, Kombairaju P et al. Deletion of Keap1 in the lung attenuates acute cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;42:524–536.
- [18] Postic C, Magnuson MA. DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genesis* 2000;26:149–150.
- [19] Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4:437–450.
- [20] Jackson EL, Willis N, Mercer K et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 2001;15:3243–3248.
- [21] Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC et al. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 2004;119:847–860.
- [22] Wang X, Spandidos A, Wang H et al. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D1144–1149.

- [23] Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 2010;12:213–223.
- [24] Umemura A, He F, Taniguchi K et al. p62, upregulated during preneoplasia, induces hepatocellular carcinogenesis by maintaining survival of stressed HCC-initiating cells. *Cancer Cell* 2016;29:935–948.
- [25] O'Dell MR, Huang JL, Whitney-Miller CL et al. Kras(G12D) and p53 mutation cause primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res* 2012;72:1557–1567.
- [26] Taguchi K, Hirano I, Itoh T et al. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol Cell Biol* 2014;34:900–913.
- [27] Hingorani SR, Wang L, Multani AS et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005;7:469–483.
- [28] Samatiwat P, Prawan A, Senggunprai L et al. Nrf2 inhibition sensitizes cholangiocarcinoma cells to cytotoxic and antiproliferative activities of chemotherapeutic agents. *Tumour Biol* 2016;37:11495–11507.
- [29] Kongpetch S, Puapairoj A, Ong CK et al. Haem oxygenase 1 expression is associated with prognosis in cholangiocarcinoma patients and with drug sensitivity in xenografted mice. *Cell Prolif* 2016;49:90–101.

- [30] Poncy A, Antoniou A, Cordi S et al. Transcription factors SOX4 and SOX9 cooperatively control development of bile ducts Dev Biol 2015;404:136–148.
- [31] Hill MA, Alexander WB, Guo B et al. Kras and Tp53 mutations cause cholangiocyte- and hepatocyte-derived cholangiocarcinoma. Cancer Res 2018;78:4445–4451.
- [32] Hamada S, Taguchi K, Masamune A et al. Nrf2 promotes mutant K-ras/p53-driven pancreatic carcinogenesis. Carcinogenesis. 2017;38:661–670.
- [33] Hamada S, Shimosegawa T, Taguchi K et al. Simultaneous K-ras activation and Keap1 deletion cause atrophy of pancreatic parenchyma. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2018;314:G65–G74.
- [34] Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1–NRF2 system in cancer. Front Oncol. 2017;7:85.
- [35] Lister A, Nedjadi T, Kitteringham NR et al. Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. Mol Cancer. 2011;10:37.

XI 図表説明

表 1: KEAP1 陰性・NQO1 陽性例(15 例)と KEAP1 陽性・NQO1 陰性例(14 例)の臨床病理学的因子の関連

表 2: SOX9 陽性例(17 例)と SOX9 陰性例(26 例) の臨床病理学的因子の関連

表 3:AKP マウスに対し AKP::Keap1 マウスで雌雄共通して発現が増加する遺伝子群を示す。

*はオス AKP マウスに対する AKP::Keap1 マウスでの発現倍率を示す。

図 1:研究背景概要

図 2:ヒト胆管癌切除標本における KEAP1 および NQO1 発現の検討

KEAP1 発現陰性、NQO1 発現陽性を示す胆管癌組織 H&E 染色 (A)、KEAP1 IHC (B)、NQO1 IHC (C)。矢頭は正常肝細胞での KEAP1 発現を示す。KEAP1 発現陽性、NQO1 発現陰性を示す胆管癌組織 H&E 染色 (D)、KEAP1 IHC (E)、NQO1 IHC (F)。

(スケールバーは 100 μ m を示す)

図 3:KEAP1 陰性・NQO1 陽性例(15 例)と KEAP1 陽性・NQO1 陰性例(14 例)での無再発生存期間および全生存期間の比較

無再発生存期間、全生存期間とも両群間に有意差を認めず。

図 4: 肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現モデルマウスの作成

- A. 肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現モデルマウス作成のための交配模式図
 - B. A マウスにおける肝組織像。肝組織に明らかな変化を認めない。
 - C. AP マウスにおける肝組織像。肝組織に明らかな変化を認めない。
 - D. AK マウスにおける肝組織像(矢頭は異型胆管上皮を示す)。わずかに異型を有する胆管上皮の増生を認める。
 - E. AKP マウスにおける肝組織像(矢頭は異型胆管上皮を示す)。わずかに異型を有する胆管上皮を認める。
- (スケールバーは 100 μ m を示す)

図 5: 肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現モデルマウスの肝体重比・血液生化学検査

- A. 生後 90 日での各マウスの肝体重比を示す。雌雄とも各群間で有意な差は認めず (N=6-10, Tukey-Kramer)。
- B. 生後 90 日での各マウスの aspartate transaminase (AST) 値を示す。雌雄とも各群間で有意な差は認めず (N=4-9, Tukey-Kramer)。
- C. 生後 90 日での各マウスの alanine transaminase (ALT) 値を示す。雌雄とも各群間で有意な差は認めず (N=4-9, Tukey-Kramer)。

D. 生後 90 日での各マウスの Hb 値を示す。雌雄とも各群間で有意な差は認めず (N=6-10, Tukey-Kramer)。

図 6: 肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現モデルマウスへの Keap1 conditional knockout の付加

A. Keap1 conditional knockout 付加肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現モデルマウス作成のための交配模式図

B. Keap1 conditional knockout 付加肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現モデルマウス・肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現モデルマウス肝組織での Keap1 および Nrf2 発現 (tubulin および Histone H3 はローディングコントロールとして提示)

図 7: 各マウス肝組織における Nqo1・cytokeratin 19・HNF4 α 発現

AK マウス H&E 染色 (A)、Nqo1 IHC (B)。AKP マウス H&E 染色 (C)、Nqo1 IHC (D)。

A::Keap1 マウス H&E 染色 (E)、Nqo1 IHC (F)。AP::Keap1 マウス H&E 染色 (G)、Nqo1 IHC (H)。AK::Keap1 マウス H&E 染色 (I)、Nqo1 IHC (J)、cytokeratin 19 IHC (K)、HNF4 α IHC (L)。AKP::Keap1 マウス H&E 染色 (M)、Nqo1 IHC (N)、cytokeratin 19 IHC (O)、HNF4 α IHC (P)。

(スケールバーは 100 μ m を示す)

図 8:Keap1 conditional knockout 付加肝特異的変異 *K-ras* および *p53* 発現モデルマウスの肝体重比・血液生化学検査

A. 生後 90 日での各マウスの肝体重比を示す。雌雄とも AK::Keap1 および AKP::Keap1 マウスで A::Keap1 マウスに比べ有意な増加を示す (N=8-12, Tukey-Kramer, ** $P < 0.01$)。

B. 生後 90 日での各マウスの AST 値を示す。雌雄とも各群間で有意な差は認めず (N=5-10, Tukey-Kramer)。

C. 生後 90 日での各マウスの ALT 値を示す。雌雄とも各群間で有意な差は認めず (N=5-10, Tukey-Kramer)。

D. 生後 90 日での各マウスの Hb 値を示す。雌雄とも各群間で有意な差は認めず (N=7-14, Tukey-Kramer)。

図 9:AKP::Keap1 マウスにみられた浸潤癌

A. AKP::Keap1 マウスに生じた胆管癌を示す (生後 81 日後)。腫瘍は充実性で白色調を呈する。

B. 浸潤癌を生じたマウスにみられた血性腹水を示す (生後 90 日後)。

C. 腹膜播種結節 (矢頭) および腹腔内リンパ節転移 (矢印) を伴った例を示す (生後 90 日後)。

D, E. 肝内に形成された腫瘍は腺腔構造を有しており、ヒト胆管癌に類似した組織を示す。

(スケールバー (白) は $400\ \mu\text{m}$ を示す・スケールバー (黒) は $100\ \mu\text{m}$ を示す)

図 10: マイクロアレイによる発現変動遺伝子の確認

A. AKP マウスに比べ AKP::Keap1 マウスにおいて正規化後の発現レベルが 2 倍以上に増加している遺伝子をマイクロアレイにて抽出。雌雄で共通して増加している 1787 プローブを同定した。

B. 典型的な Nrf2 標的遺伝子である *Nqo1*、*Gstm1* およびマイクロアレイで増加がみられた *Sox4*、*Sox9* 遺伝子につきリアルタイム PCR で発現増加を確認した (N=4, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Tukey-Kramer)。

C. AK マウス肝組織 Sox9 IHC を示す。胆管細胞が陽性を示す。

D. AKP マウス肝組織 Sox9 IHC を示す。胆管細胞が陽性を示す。

E. AK::Keap1 マウス肝組織 Sox9 IHC を示す。増生した異型胆管細胞が陽性を示す。

F. AKP::Keap1 マウス肝組織 Sox9 IHC を示す。増生した異型胆管細胞が陽性を示す。

(スケールバーは 100 μ m を示す)

図 11: ヒト胆管癌切除標本における KEAP1、NQO1 および SOX9 発現の検討

KEAP1 発現陰性、NQO1 発現陽性、SOX9 陽性を示す胆管癌組織 H&E 染色 (A)、KEAP1 IHC (B)、NQO1 IHC (C)、SOX9 IHC (D)。KEAP1 発現陽性、NQO1 発現陰性、SOX9 陰性を示す胆管癌組織 H&E 染色 (E)、KEAP1 IHC (F)、NQO1 IHC (G)、SOX9 IHC (H)。

(スケールバーは 100 μ m を示す)

図 12:SOX9 陽性例(17 例)と SOX9 陰性例(26 例)での無再発生存期間および全生存期間の比較

無再発生存期間、全生存期間とも両群間に有意差を認めなかった。

図 13:膵癌モデルマウス、KPC マウスへの Keap1 conditional knockout の付加

A. Keap1 conditional knockout 付加 KPC マウス作成のための交配模式図

B. Keap1 conditional knockout 付加 KPC マウスの生存曲線を示す。K::Keap1 マウス及び KP::Keap1 マウスは雌雄とも早期に死亡する。

図 14:Keap1 conditional knockout 付加 KPC マウスの体重変化・生化学検査

A. 生後 35 日時点での体重を示す。C::Keap1 マウスに比べ K::Keap1 マウス及び KP::Keap1 マウスは有意な体重減少を来す(N=8, Tukey-Kramer, ** $P < 0.01$)。

B. 生後 90 日または endpoint での血糖値を示す。C::Keap1 マウスに比べ K::Keap1 マウス及び KP::Keap1 マウスでは有意な血糖値の低下を示す(N=8, Tukey-Kramer, ** $P < 0.01$)。

図 15:Keap1 conditional knockout 付加 KPC マウス膵の肉眼像

A. 生後 15 日の C::Keap1 膵では萎縮などは認めない。

B. 生後 15 日の P::Keap1 膵では萎縮などは認めない。

C. 生後 45 日の K::Keap1 膵は白色で固い線維性組織に置換されている。

D. 生後 41 日の KP::Keap1 膵は白色で固い線維性組織に置換されている。

図 16:Keap1 conditional knockout 付加 KPC マウス膵の組織像

A, B. C::Keap1 および P::Keap1 マウス生後 90 日の組織像を示す。特に膵組織の構造に異常はない。

C, D. K::Keap1 マウス生後 82 日、KP::Keap1 マウス生後 76 日の組織像を示す。膵腺房細胞およびラ氏島は変性脱落し、線維化を認める。

E, F. C::Keap1 および P::Keap1 マウス生後 90 日の Nqo1 IHC を示す。ラ氏島および導管細胞を中心に染色がみられる。

G, H. K::Keap1 マウス生後 82 日、KP::Keap1 マウス生後 76 日の Nqo1 IHC を示す。残存した腺管構造は Nqo1 陽性を示す。

(スケールバーは 100 μ m を示す)

図 17:Keap1 conditional knockout 付加 KPC マウス膵生後 14 日の組織像

A, B. C::Keap1 および P::Keap1 マウス生後 14 日の組織像を示す。特に膵組織の構造に異常はない。

C, D. K::Keap1 および KP::Keap1 マウス生後 14 日の組織像を示す。膵腺房細胞およびラ氏島周囲に炎症細胞浸潤を認める。

E-H. C::Keap1、P::Keap1、K::Keap1 および KP::Keap1 マウス生後 14 日の Nqo1 IHC を示す。ラ氏島および導管細胞を中心に染色がみられる。

I, J. C::Keap1 および P::Keap1 マウス生後 14 日の α SMA IHC を示す。血管壁にのみ染色がみられる。

K, L. K::Keap1 および KP::Keap1 マウス生後 14 日の α SMA IHC を示す。腺房細胞周囲の紡錘形細胞に染色がみられる。

(スケールバーは 100 μ m を示す)

表 1

	KEAP1 (-), NQO1 (+) N (%)	KEAP1 (+)/NQO1 (-) N (%)	<i>P</i> 値
肝内胆管癌	7 (63.6)	4 (36.4)	0.32 *1
肝門部領域胆管癌	8 (44.4)	10 (55.6)	
R0 切除	10/15 (66.7)	9/14 (64.3)	0.89 *1
Stage 1	2 (13.3)	1 (7.1)	0.33 *2
Stage 2	3 (20.0)	7 (50.0)	
Stage 3	4 (26.7)	1 (7.1)	
Stage 4	6 (40.0)	5 (35.8)	
ly 0	3 (20.0)	5 (35.7)	0.29 *2
ly 1	3 (20.0)	5 (35.7)	
ly 2	6 (40.0)	4 (28.6)	
ly3	3 (20.0)	0 (0)	
v0	3 (20.0)	2 (14.3)	0.87 *2
v1	3 (20.0)	5 (35.7)	
v2	7 (46.7)	5 (35.7)	
v3	2 (13.3)	2 (14.3)	
リンパ節転移あり	7/15 (46.7)	4/14 (28.6)	0.32 *1

*1 χ^2 検定

*2 Fisher の正確検定

表 2

	SOX9 (+) N (%)	SOX9 (-) N (%)	<i>P</i> 値
肝内胆管癌	8 (53.3)	7 (46.7)	0.18 *1
肝門部領域胆管癌	9 (32.1)	19 (67.9)	
R0 切除	12/17 (70.6)	15/26 (57.7)	0.39 *1
Stage 1	1 (5.9)	2 (7.7)	0.82 *2
Stage 2	5 (29.4)	9 (34.6)	
Stage 3	5 (29.4)	4 (15.4)	
Stage 4	6 (35.3)	11 (42.3)	
ly 0	3 (17.7)	7 (26.9)	0.77 *2
ly 1	4 (23.5)	8 (30.8)	
ly 2	7 (41.1)	8 (30.8)	
ly3	3 (17.7)	3 (11.5)	
v0	2 (11.8)	3 (11.5)	0.87 *2
v1	6 (35.3)	6 (23.1)	
v2	8 (47.0)	9 (34.6)	
v3	1 (5.9)	8 (30.8)	
リンパ節転移あり	7/17 (41.2)	10/26 (38.5)	0.86 *1

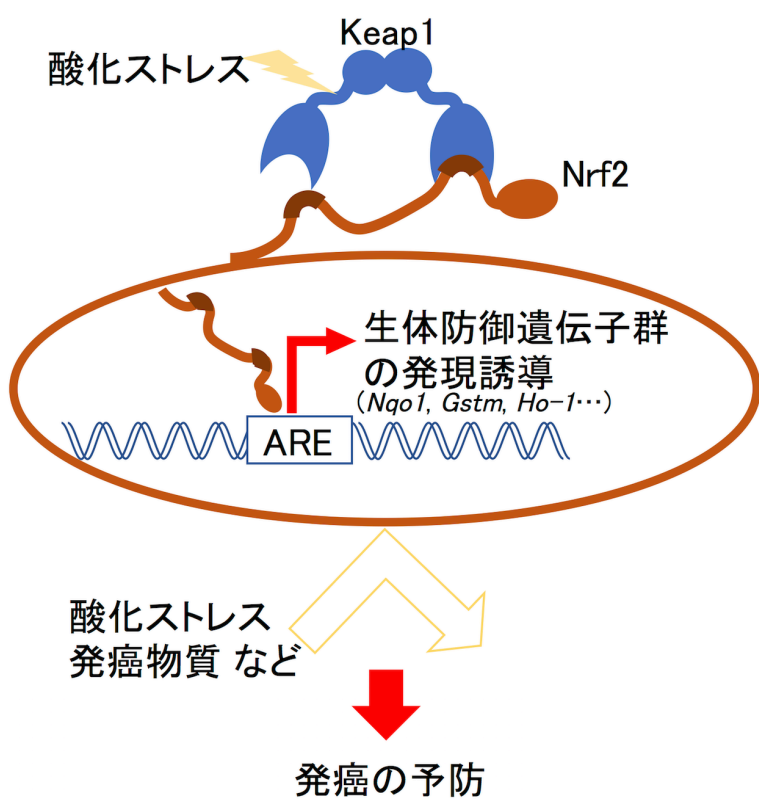
*1 χ^2 検定

*2 Fisher の正確検定

表 3 AKB::Keap1 マウスで増加する遺伝子群の一覧

Gene symbol	Fold change*	Description
Nrf2-target genes		
Abcc12	199.6	ATP-binding cassette, sub-family C, member 12
Gpx2	193.5	glutathione peroxidase 2
Gsta2	66.6	glutathione S-transferase, alpha 2
Abcc4	35.9	ATP-binding cassette, sub-family C, member 4
Nqo1	25.9	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
Gstm3	18.1	glutathione S-transferase, mu 3
Abcc8	12.7	ATP-binding cassette, sub-family C, member 8
Gstm1	7.8	glutathione S-transferase, mu 1
Gstm4	7.3	glutathione S-transferase, mu 4
Abcc1	5.0	ATP-binding cassette, sub-family C, member 1
Cholangiocyte-related genes		
Ggt1	12.5	gamma-glutamyltransferase 1
Epcam	8.8	epithelial cell adhesion molecule
Krt7	8.1	keratin 7
Krt19	8.1	keratin 19
Sox9	4.1	SRY (sex determining region Y)-box 9
Sox4	3.8	SRY (sex determining region Y)-box 4
Ggt7	2.1	gamma-glutamyltransferase 7

正常細胞



癌細胞

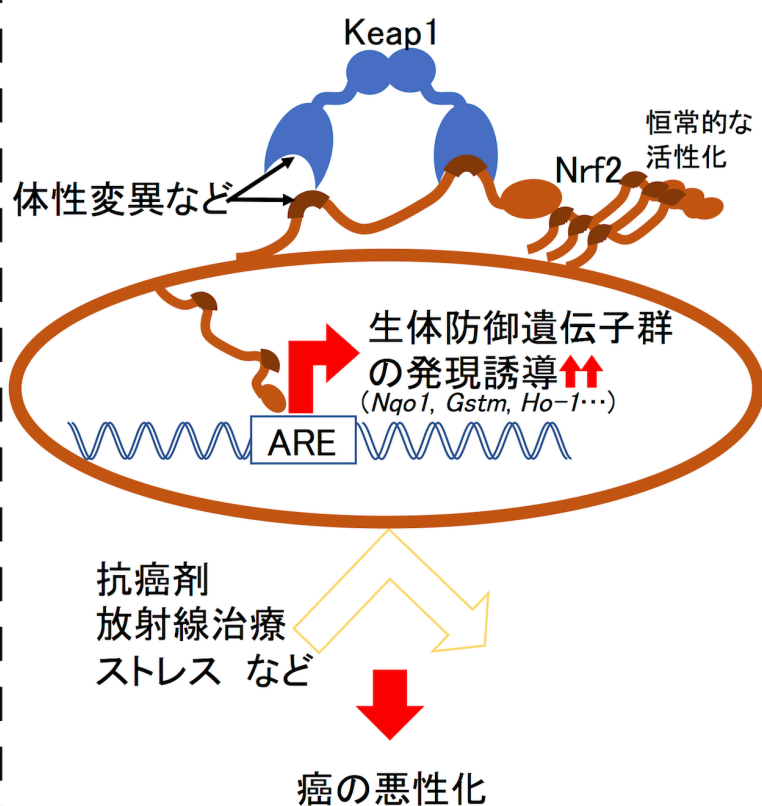


図1

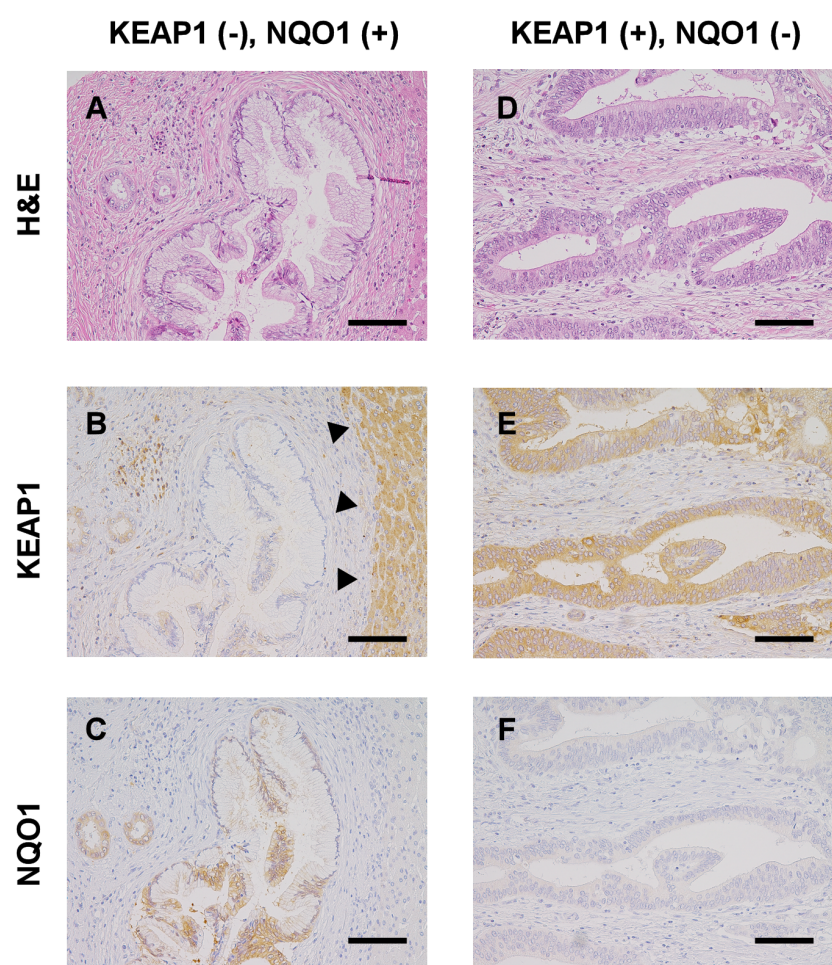
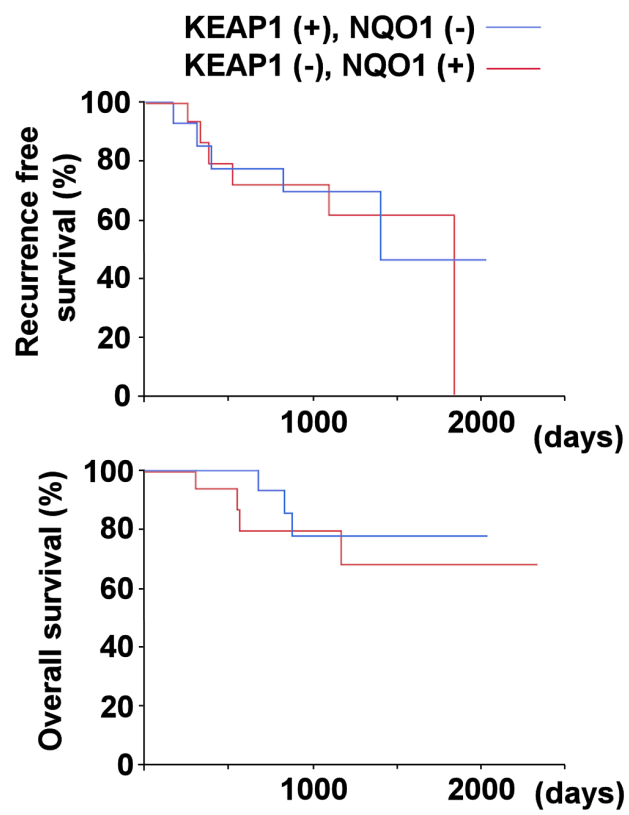


图2



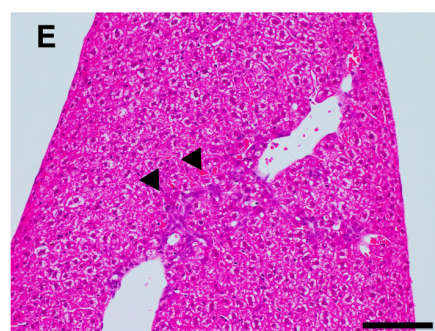
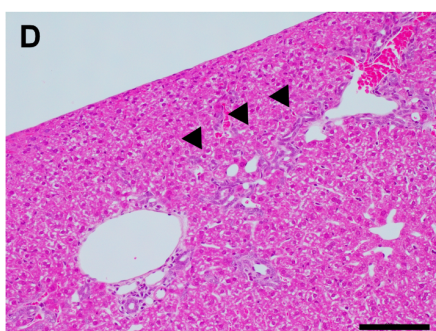
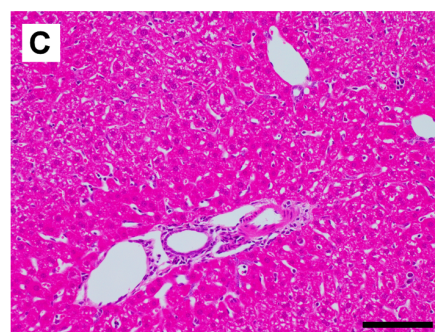
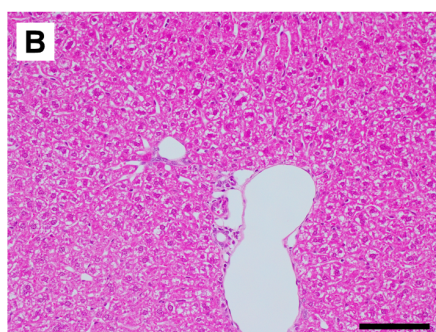
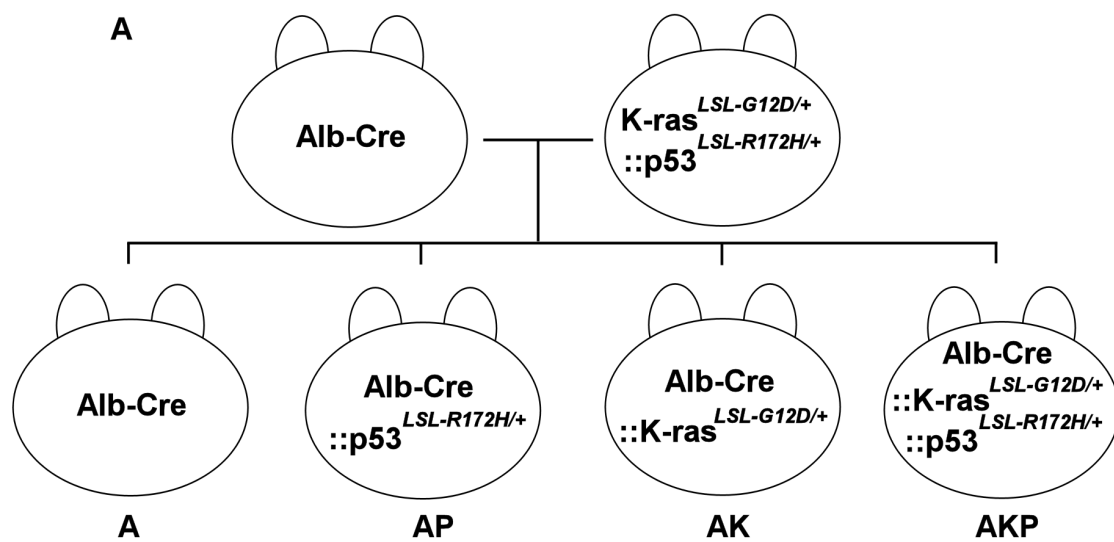
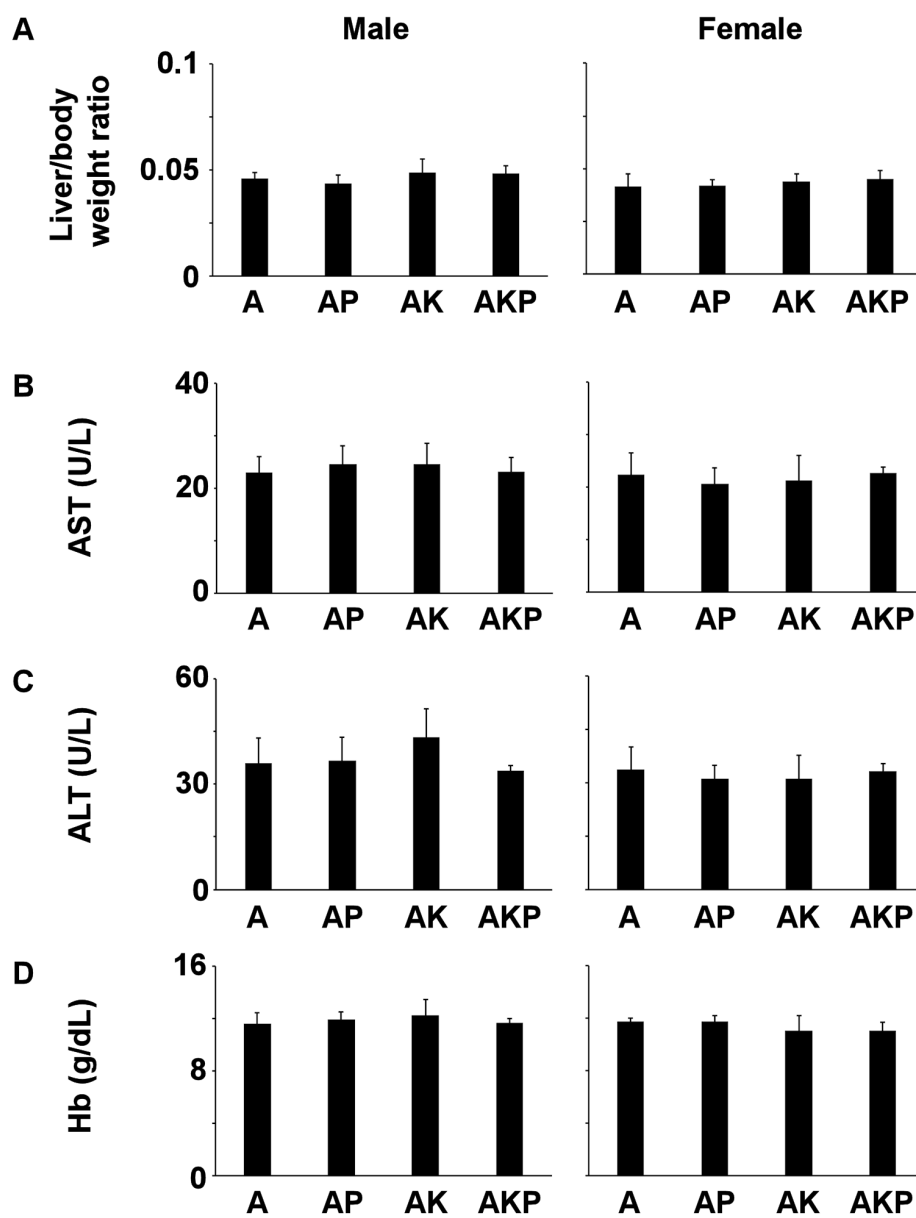
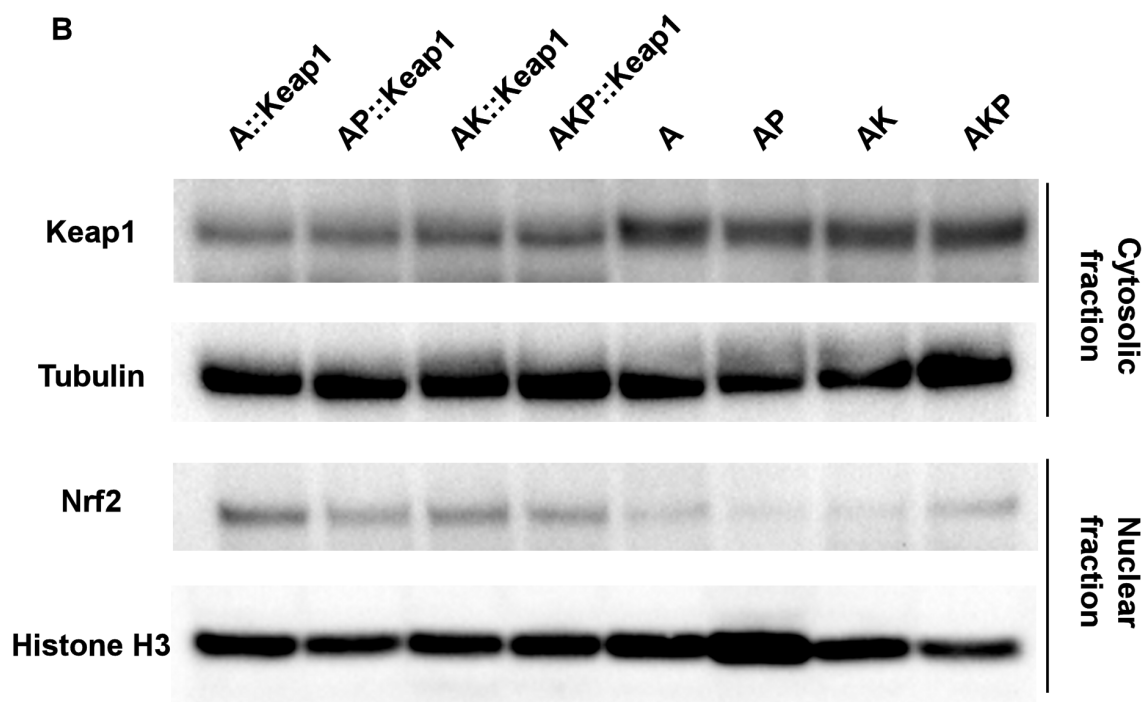
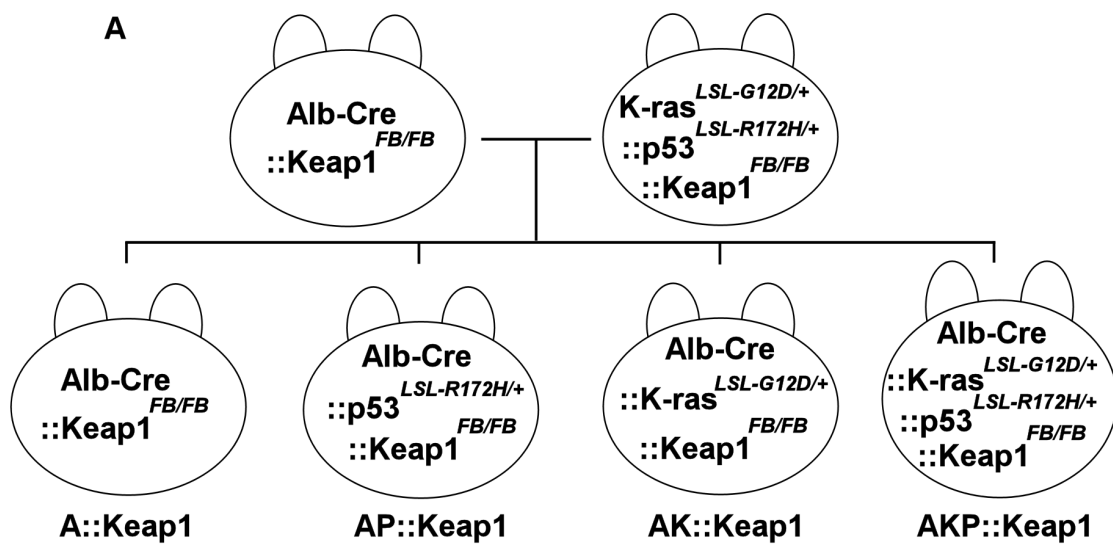
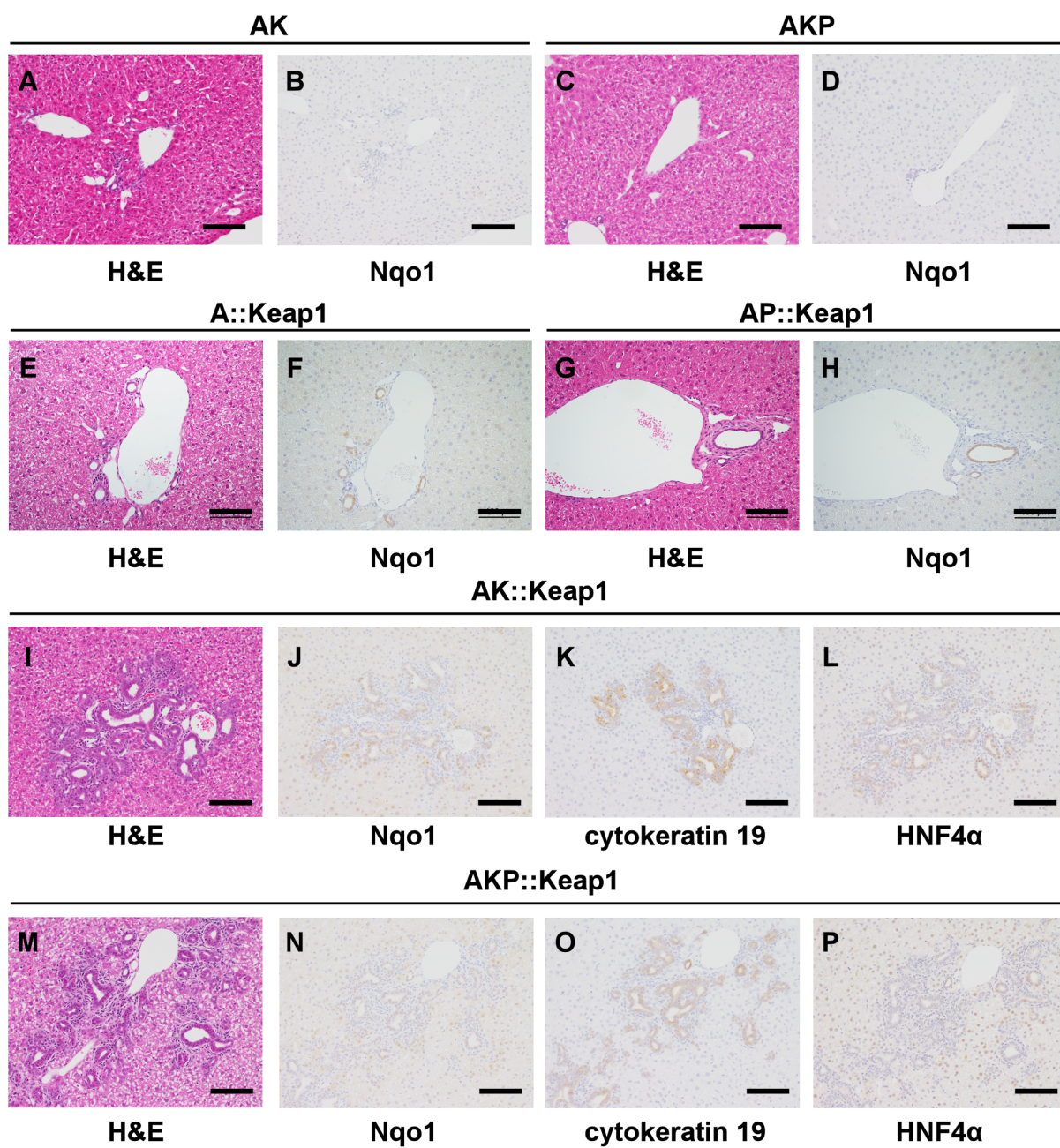
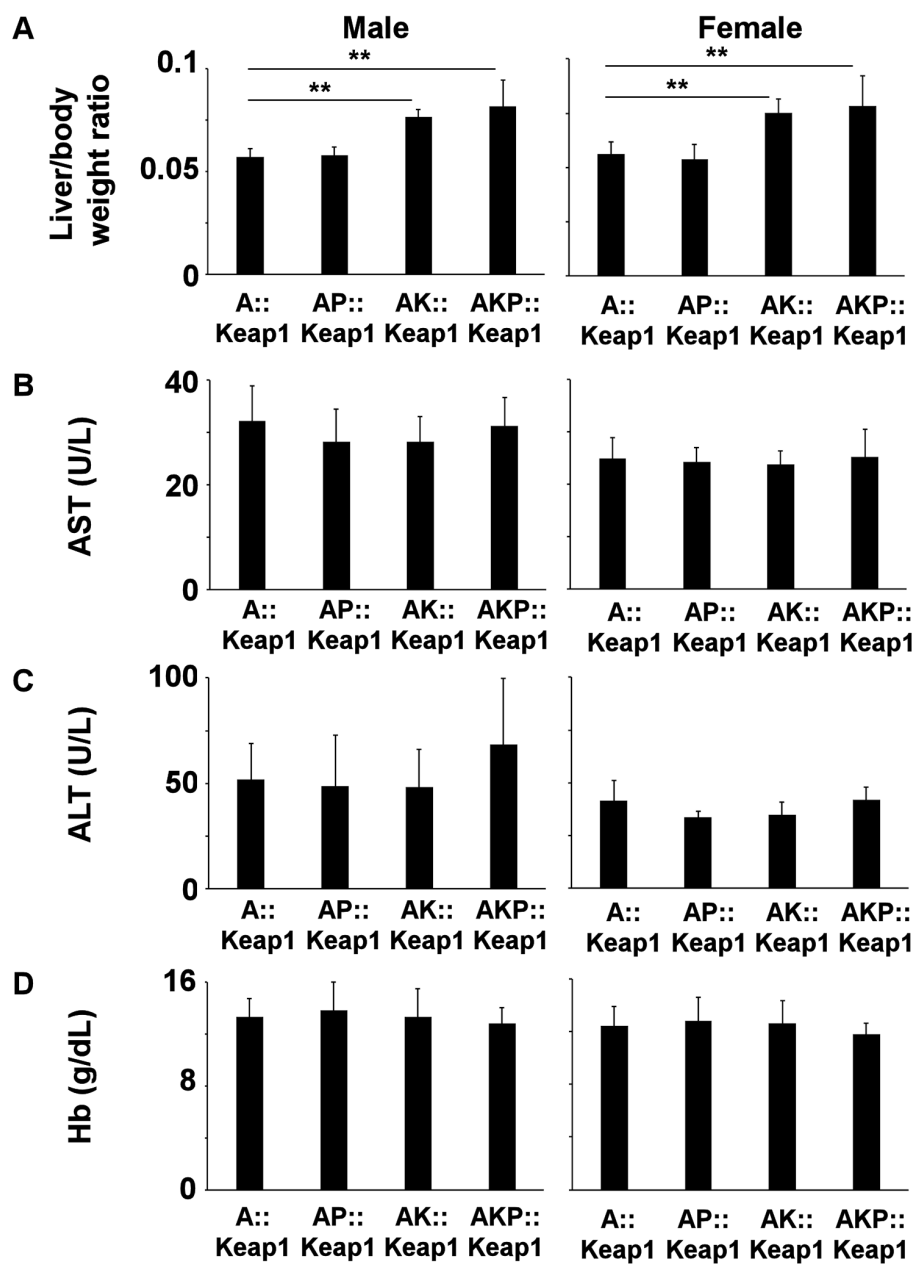


图4









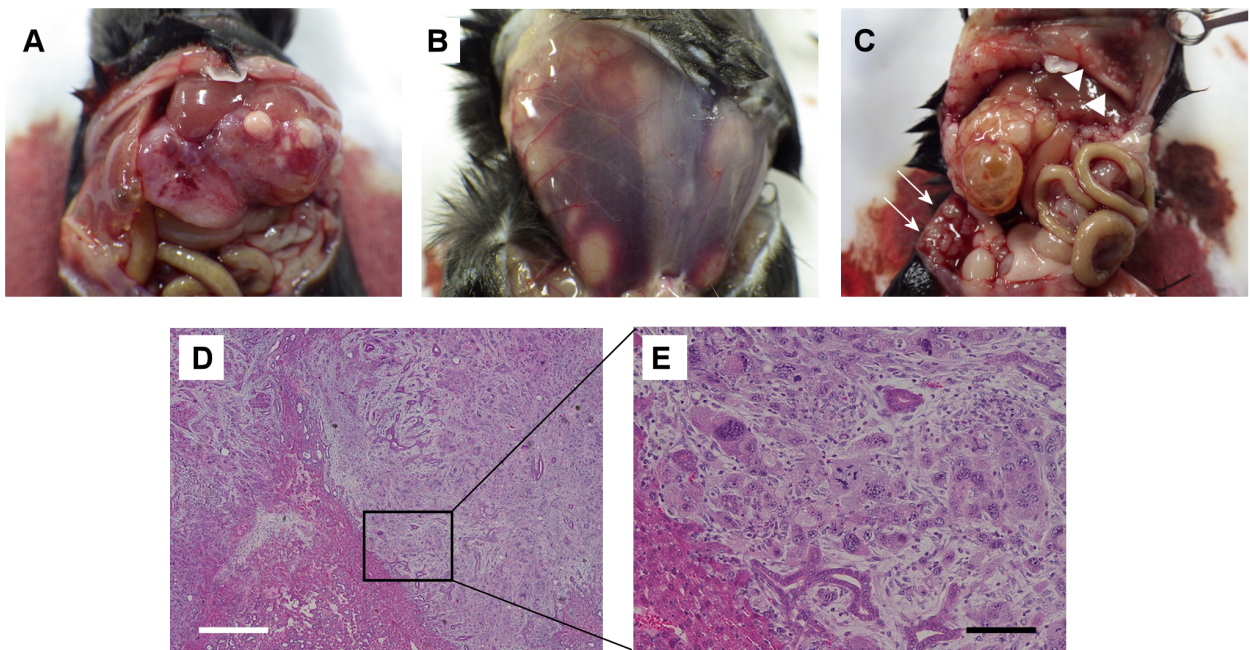
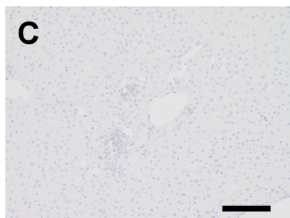
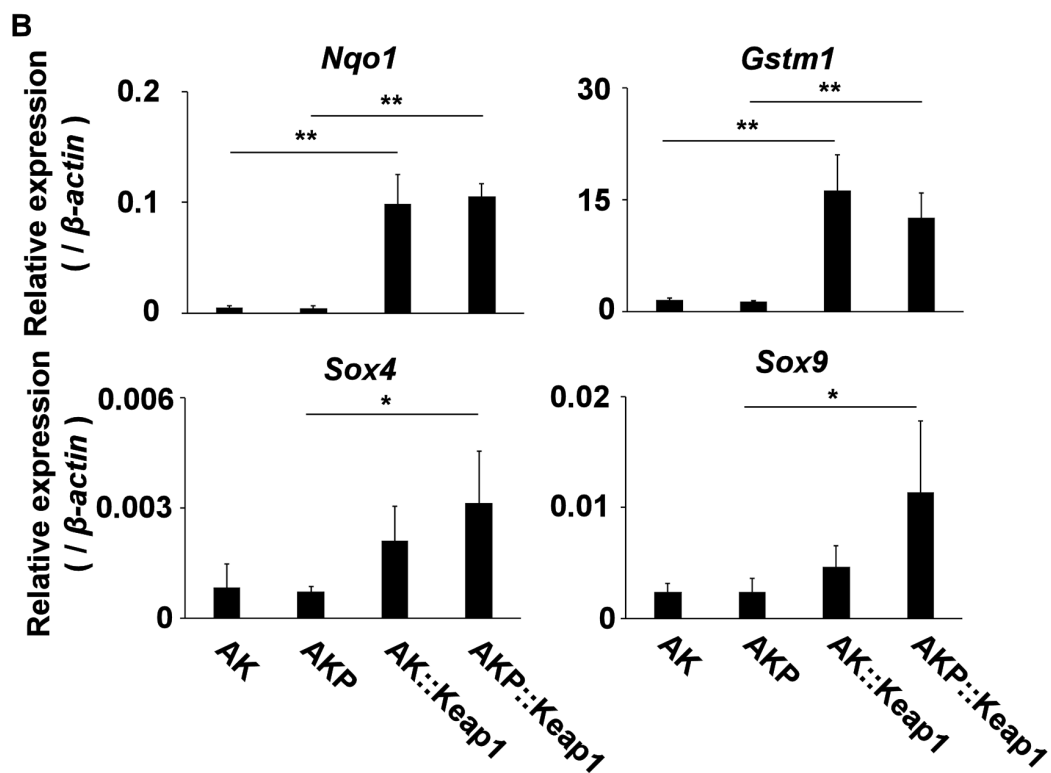
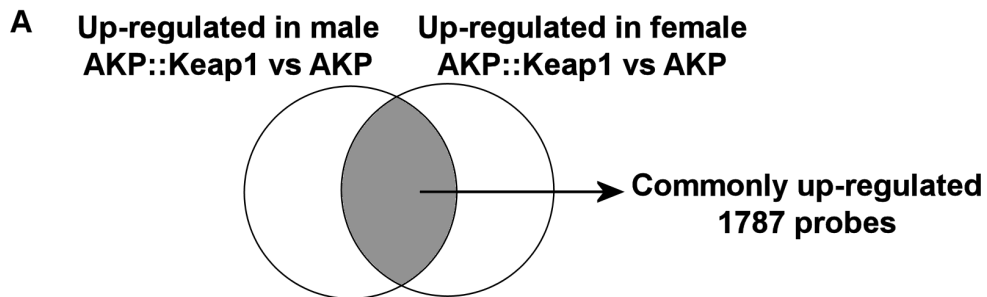
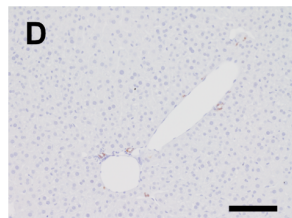


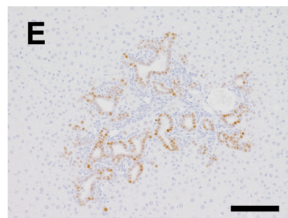
图9



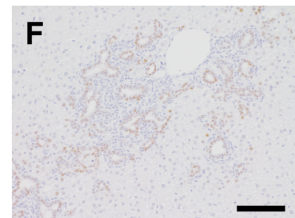
AK



AKP



AKP::Keap1



AKP::Keap1

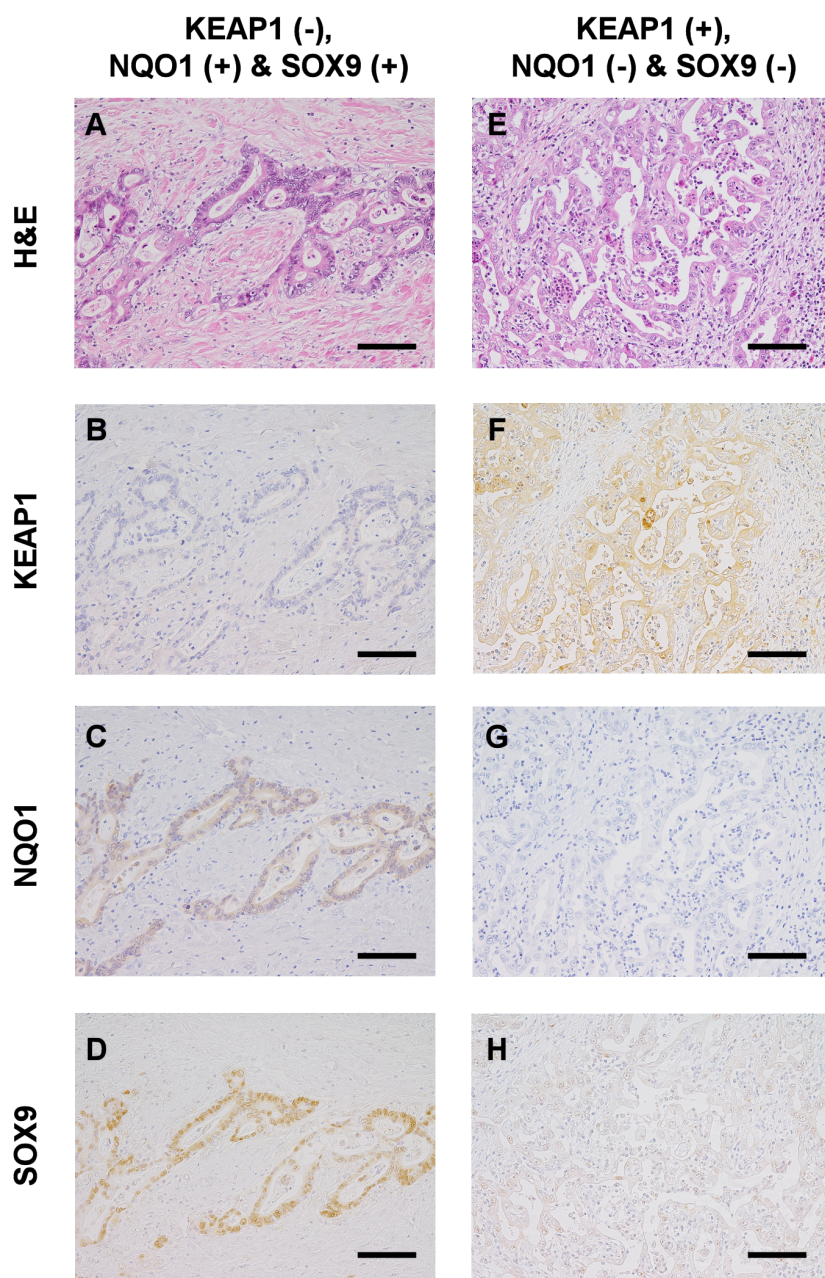


图11

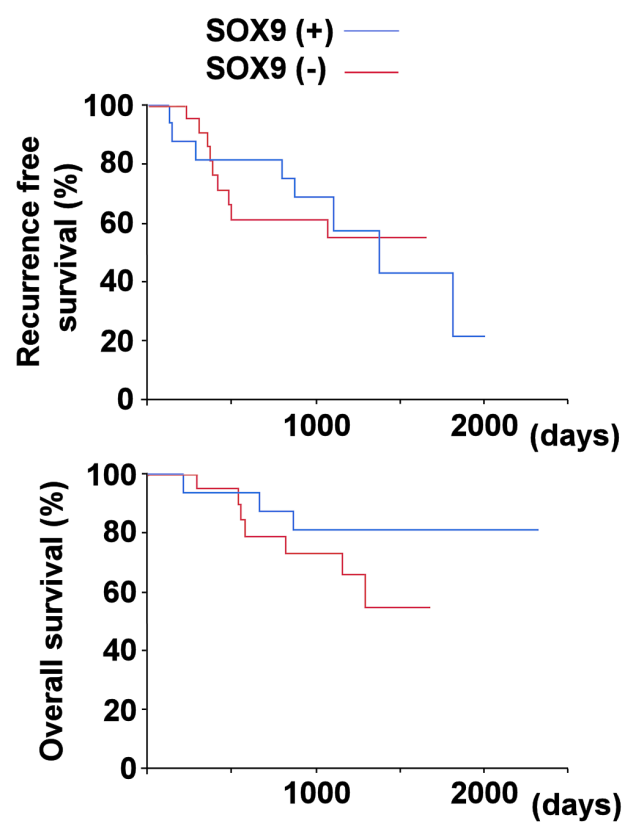
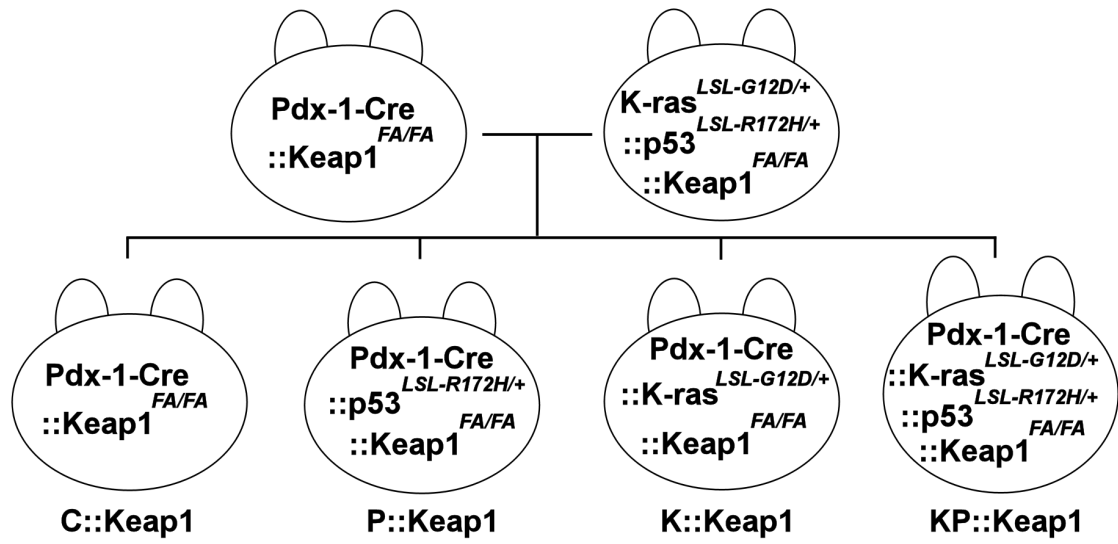
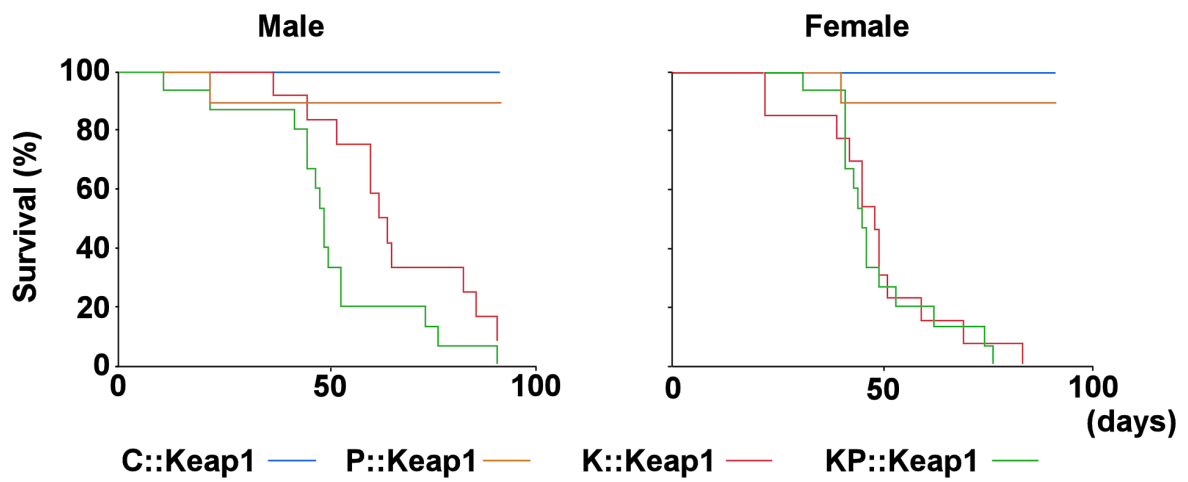


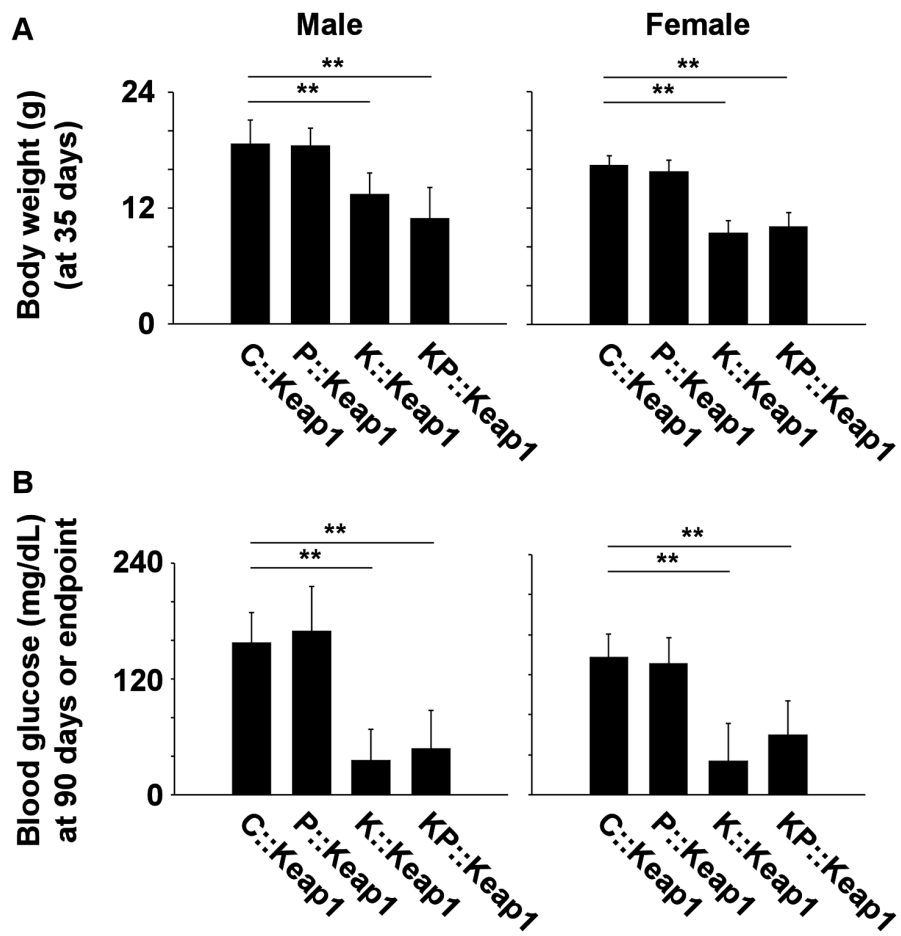
图12

A



B

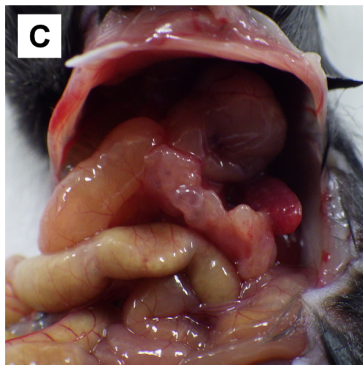
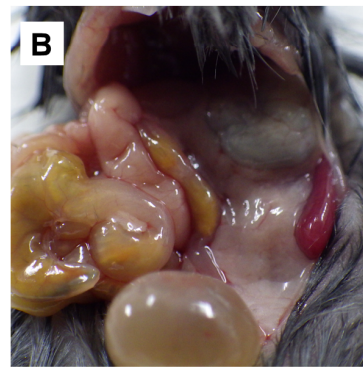




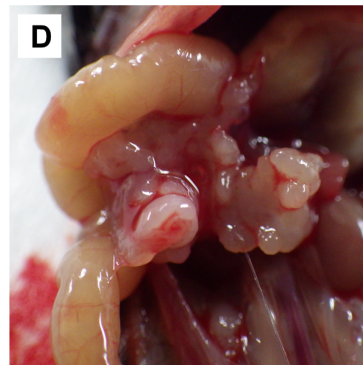
C::Keap1 15days



P::Keap1 15days



K::Keap1 45days



KP::Keap1 41days

